



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, C12P 21/02, C12N 9/12, 1/21</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/03663</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月29日(29.01.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01050</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月27日(27.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 08/685,625 1996年7月24日(24.07.96) US 特願平8/256747 1996年9月27日(27.09.96) JP</p> <p>(71) 出願人 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISYA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) 上野直人(UENO, Naoto)[JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区北26条東3丁目 北光公務員宿舎1-101 Hokkaido, (JP)</p> <p>(72) 発明者 松本邦弘(MATSUMOTO, Kunihiro) 〒464 愛知県名古屋市中千種区北千種2-1-43 萱場住宅1-205 Aichi, (JP) 入江賢児(IRIE, Kenji) 〒466 愛知県名古屋市中昭和区陶生町2-15-B22 Aichi, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: HUMAN TAKI DNA ENCODING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトTAKIおよびそれをコードするDNA</p> <p>(57) Abstract A TGF-<math>\beta</math> activated kinase containing an amino acid sequence corresponding to the sequence ranging from 1-Met to 579-Ser residues of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:5.</p>		

(57) 要約

配列番号：5のアミノ酸配列中の1位のMetから579位のSerまでのアミノ酸配列を含むTGF- $\beta$ 活性化キナーゼ、及びそれをコードするDNA。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	モルダヴィア共和国	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CC	中東アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KZ	中央アジア諸国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KZ	中央アジア諸国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

## 明 細 書

ヒトTAK1およびそれをコードする DNA

## 技術分野

本発明は、トランスフォーミング成長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリーの情報伝達系を担う、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ (Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase; TAK1)、及びその製造方法、並びにそれをコードするヒトの遺伝子に関する。TAK1は、MAPKキナーゼのアクチベーター (Activator of MAPK Kinase; AMK-1)とも称され、TGF- $\beta$ およびBMP (bone morphogenetic protein) により活性化され且つMAPKキナーゼをリン酸化して活性化する酵素である。

## 背景技術

TGF- $\beta$  スーパーファミリーの受容体は細胞質内領域に Ser/Thr キナーゼを含み、その膜貫通ドメインに近いアミノ末端側に Gly, Ser の繰返し配列 (GS box) を有する I 型、及び GS box を有しない II 型に分類される。TGF- $\beta$  の場合、リガンドが II 型受容体に結合した後に I 型受容体との複合体を形成し、構成的にリン酸化されている II 型受容体のキナーゼが I 型受容体の GS box 付近をリン酸化し、これによって I 型受容体が活性化されることにより前記リガンドからのシグナルが細胞内に伝達されることが考えられている。しかしながら、この受容体より下流の伝達分子についてはほとんど知られていない。

真核生物である出芽酵母サッカロミセス・セレビシエー (Saccharomyces cerevisiae) においては、細胞外からの接合フェロモン

(Mating pheromone) により接合が生ずるまでの情報伝達カスケードとして、接合フェロモンによりGプロテインが活性化され、GプロテインがMAPKKキナーゼ(MAPKKK)(Ste11)を活性化し、活性化されたMAPKKKがMAPKキナーゼ(MAPKK)をリン酸化して活性化し、次により活性化されたMAPKK(Ste7)がMAPキナーゼ(マイトジェン-活性化プロテインキナーゼ; mitogen-activated protein kinase; MAPK)をリン酸化して活性化し、最後にMAPKがFUS1蛋白質を活性化して細胞の接合が開始されることが知られている。

このようなMAPKKKとして、マウスより得られたTAK1(TGF- $\beta$  Activated Kinase1)がこれまでに知られている(K, Yamaguchi et al., Science (1995) 270, 2008-2011)。

#### 発明の開示

本発明は、哺乳類のTGF- $\beta$ の受容体のシグナル伝達系において、受容体よりも下流に位置し、該シグナルの伝達に関与する新規な因子、それをコードする遺伝子、及び当該因子の製造方法を提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、上記接合フェロモンの情報伝達カスケードにおけるMAPKKK(Ssk2/Ssk22, Sho1)の活性が欠損した酵母サッカロミセス・セレビシエーにヒト由来のcDNAを挿入し、活性が欠損したMAPKKKを補完できるcDNAについてスクリーニングし、活性が欠損したMAPKKKを補完し得るcDNAをクローニングすることに成功し、本発明を完成した。

従って、本発明は、配列番号：5に示す23位のSerから579位のSerまでのアミノ酸配列を含んでなる、トランスフォーミング成長因子(TGF)- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドを提供する。

また、本発明は、配列番号：5に示す1位の Metから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドを提供する。

また、本発明は、配列番号：5に示す23位の Serから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNAを提供する。

また、本発明は、配列番号：5に示す 249位の Tから1919位の Aまでのヌクレオチド配列を有する、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNAを提供する。

また、本発明は、配列番号：5に示す1位の Metから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNAを提供する。

また、本発明は、配列番号：5に示す 183位の Aから1919位の Aまでのヌクレオチド配列を有する、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNAを提供する。

また、本発明は、上記のいずれかの DNAを含んでなるベクター、上記のいずれかの DNAを含んでなるベクターにより形質転換された宿主細胞、上記のいずれかの DNAを含んでなるベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、培養物から産生物を採取することからなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法を提供する。

また、本発明は、上記の方法により製造されるTGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチド、また、配列番号：5に示す23位の Serから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼを提供する。

さらに、本発明は上記のポリペプチド、蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、酵母発現ベクター pNV11を示す。

図 2 は、種々の TAK1 遺伝子の発現に対する TGF- $\beta$  の添加効果を、ルシフェラーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として用いて調べた結果を示すグラフである。

図 3 は、MC3T3-E1 細胞における TAK1 遺伝子の活性に対する TGF- $\beta$  及び BMP-4 の効果を免疫沈降法およびカップル・キナーゼ法により測定した結果を示すグラフである。

図 4 は、HA-TAK1 遺伝子でトランスフェクトされた細胞における TAK1 キナーゼ活性に対する種々の濃度の TGF- $\beta$  又は BMP-4 の効果を示すグラフである。TAK1 $\Delta$ N は TAK1 $\Delta$ N 遺伝子でトランスフェクトされた細胞を TGF- $\beta$  及び BMP-4 のいずれによっても刺激しなかった場合の結果を示す。

図 5 はマウス TAK1 をコードする DNA の塩基配列とヒト TAK1 をコードする DNA の塩基配列との対比を示す。

図 6 はマウス TAK1 をコードする DNA の塩基配列とヒト TAK1 をコードする DNA の塩基配列との対比を示す。

図 7 はマウス TAK1 をコードする DNA の塩基配列とヒト TAK1 をコードする DNA の塩基配列との対比を示す。

図 8 はマウス TAK1 をコードする DNA の塩基配列とヒト TAK1 をコードする DNA の塩基配列との対比を示す。

図 9 はマウス TAK1 をコードする DNA の塩基配列とヒト TAK1 をコードする DNA の塩基配列との対比を示す。

図 10 は、マウス TAK1 のアミノ酸配列とヒト TAK1 のアミノ酸配列の対比を示す。

図 11 は、マウス TAK1 のアミノ酸配列とヒト TAK1 のアミノ酸配列の対比を示す。

### 発明の実施の形態

本発明によれば、目的とする遺伝子のクローニングに際しては、例えば、MAPKKKの活性を欠損しており且つカスケードの末端に容易に検出可能なリポーター遺伝子を有する酵母に哺乳類のcDNAを含む発現ベクターを導入し、欠損したMAPKKK活性を補完するcDNAが挿入されたか否かを、リポーター遺伝子の発現により検出すればよい。さらに、例えば、高浸透圧シグナル伝達系のもとで機能する、Ssk2/Ssk22 及びSho1活性を欠く他の酵母を使用することもできる。

このような検出系として、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中の、接合フェロモン (Mating pheromone) の情報を伝達するMAPK経路 (I. Herskowitz, Cell, Vol. 80, 187 (1995); D. E. Lein et al., Curr. Opin. Cell Biol. Vol. 7, 197 (1995); J. Schulz et al., Curr. Opin. Gene Dev., Vol. 5, 31 (1995)) を用いることができる。この系における正常な情報伝達カスケードは Ste11キナーゼ、Ste7キナーゼ、及びFus3/Kss1キナーゼから成り、これらはそれぞれ MAPKKK, MAPKK及びMAPKに相当する。Ste11, Ste7、及びFus3/Kss1は逐次的に作用してシグナルを転写因子 Ste12に伝達し、このSte12はFUS1のごとき接合特異的 (mating specific) 遺伝子の転写を活性化する。

cDNAのスクリーニングに際しては、上記のカスケード中Ste7の機能的変異 (STE7<sup>P368</sup>) 及びSte11の欠損変異 (Ste11 $\Delta$ ) を含むカスケードを用いることができ (K. Irie et al., Science Vol. 265, 1716 (1994))、この系においては、接合経路に対応するリポーター遺伝子 FUS1p::HIS3により付与されるヒスチジン表現型 (His) によりモニターする場合、哺乳類 Raf又はMEKKの活性化型 (それぞれ Raf $\Delta$ N 又はMEKK $\Delta$ N) がSte7<sup>P368</sup> 依存的にSte11活性の欠損を補完することができることが確認されている。従って、上記の変異したカス

ケードを有する酵母に被験cDNAを導入して、ヒスチジン表現型を検出することにより *StellΔ* (MAKKK欠損) を補完することができるcDNAを選択することができる。

被験cDNAライブラリーとしては、任意の哺乳動物由来のcDNAライブラリーを用いることができるが、一例として、マウスの細胞系、例えばマウス細胞系 BAF-B03からのcDNA発現ライブラリーを用いることができる。このcDNAライブラリーは、マウスIL-3依存性pro- $\beta$ 細胞系である BAF-B03から poly(A)-RNAに対するcDNAを、酵母発現ベクター pNV11のTDH3プロモーターの制御下にクローニングすることにより得られる。使用される被験cDNAライブラリーの他の例は、ヒト細胞系、例えばヒト細胞系 JurkatからのcDNA発現ライブラリーである。

上記のcDNAライブラリーを前記のスクリーニング系によりスクリーニングすることにより1個の陽性クローンを得た。このクローンのcDNAの塩基配列及びそれによりコードされるアミノ酸配列は、配列番号：1のヌクレオチド番号223～1893、及びアミノ酸番号23～579に相対する。

ヒト細胞系からのcDNAライブラリーは上記のスクリーニング系に従ってスクリーニングすることができる。あるいは、ヒト細胞系からのcDNAライブラリーは、前記のようにして得られたマウスcDNAをプローブとして使用してスクリーニングすることができる。

他の陽性クローンのcDNA及びそれによりコードされるアミノ酸配列は配列番号：5に示すヌクレオチド249～1919及びアミノ酸23～579に相当する。

さらに長いcDNA(全長cDNA)を得るため、前記のcDNAをプローブとして用いて、上記のcDNAライブラリーをスクリーニングし、複数の陽性クローンを得た。これらのクローンは、前記のcDNAに対して



、約 230bpの 5' - 延長部分を有していた。この 5' - 末端延長部分を有する cDNA を TAK1 cDNA と称し、この 5' - 末端延長部分を有しない最初にクローニングした cDNA を TAK1 $\Delta$ N cDNA と称する。TAK1 cDNA のヌクレオチド配列を配列番号：1 の 1 ～ 2443 に示し、それによりコードされているアミノ酸配列を配列番号：1 のアミノ酸番号：1 ～ 579 に示す。このアミノ酸配列により示される蛋白質又はポリペプチドを TAK1 蛋白質又はポリペプチドと称する。これに対して、TAK1 $\Delta$ N cDNA によりコードされているアミノ酸配列により示される蛋白質又はポリペプチドを TAK1 $\Delta$ N 蛋白質又はポリペプチドと称する。さらに、ヒト TAK1 cDNA のヌクレオチド配列は配列番号：5 のヌクレオチド 1 - 2656 により示され、そしてそれによりコードされるアミノ酸配列は配列番号：5 のアミノ酸 1 - 579 により示される。

TAK1 蛋白質の 1 次アミノ酸配列から、この蛋白質は N - 末端側のプロテインキナーゼ触媒ドメインと約 300 アミノ酸残基の C - 末端ドメインを有することが示唆される。この触媒ドメインはプロテインキナーゼ・サブドメイン I ～ XI (S. K. Hanks et al., Science 241, 42 (1988)) に対応するコンセンサス配列を含有する。この触媒ドメインは Raf-1 (T. I. Bonner et al., Nucleic Acids Res. Vol. 14, 1009 (1986)) 及び MEKK (C. A. Langer-Carter et al., Science Vol. 260, 315 (1993)) の触媒ドメインのアミノ酸配列と約 30% の同一性を有する。前記触媒ドメインに続く C - 末端の 300 アミノ酸残基の配列は他の蛋白質との顕著な相同性を有しない。

N - 末端の 22 個のアミノ酸のコドン欠缺 TAK1 $\Delta$ N cDNA を *stell* $\Delta$  変異を有する酵母に導入すれば *stell* $\Delta$  変異 (MAPKKK 欠損) を補完するが、全長の TAK1 cDNA を *stell* $\Delta$  変異株に導入した場合 *stell* $\Delta$  変異を補完しない。従って、TAK1 キナーゼは N - 末端の 22 個の

アミノ酸の除去により活性化されると考えられる。

従って本発明は、配列番号：5のアミノ酸配列中の1位のMetから579位のSerまでのアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードするDNAを提供する。このDNAには、典型的な例として、23位のアミノ酸Serから579位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列から成るポリペプチドをコードするDNA、及び30位のアミノ酸Gluから295位のアミノ酸Aspまでのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAが含まれる。しかしながら、本発明のDNAは、上記のものに限られるものではなく、1位のMet～30位のGluの間のいずれかのアミノ酸から295位のアミノ酸Aspまでのアミノ酸配列から成るポリペプチドをコードするDNAをも包含する。

延長されたN-末端を有するポリペプチドをコードするDNAであっても、発現後のポリペプチドのプロセッシングにより活性な酵素を得ることができ、またC末端のキナーゼ以外の領域を欠いていても同様のキナーゼ活性を有すると容易に想像できるからである。

本発明はまた、上記種々のDNAのヌクレオチド配列に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド又は蛋白質、特にTAK1活性を保持しているポリペプチド又は蛋白質を提供する。より具体的な例として、本発明は、上記種々のDNAを、例えばベクター、特に発現ベクターに挿入した状態で宿主細胞、例えば動物細胞又は微生物細胞に導入して発現されるポリペプチド又は蛋白質、特にTAK1活性を有するポリペプチド又は蛋白質に関する。

典型的には、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、配列番号：5に示すアミノ酸配列中の1位のMet(これを含む)～23位のSer(これを含む)の間のいずれかのアミノ酸から579位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列を有する。

また、本発明はさらに、上記のポリペプチド又は蛋白質と他の蛋

白質との融合蛋白質を提供する。TAK1活性を有するポリペプチド又は蛋白質と融合される他の蛋白質は、実施例に記載されているヘマグルチニンの他、適宜選択することができる。TAK1活性を有するポリペプチド又は蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質をコードする DNAは、実施例 4 に記載の方法により構築され、発現させることができる。

前記のごとく、ヒト TAK1 をコードする cDNA はマウス TAK1 をコードする cDNA を用いて得ることができ、そして実施例 5 及び 6 は、ヒト TAK1 をコードする cDNA の単離を示す。

前記種々の本発明の DNA は、例えば実施例 2 に記載する方法により動物細胞から、例えば cDNA としてクローニングすることができる。生来の cDNA に対して変異又は修飾された DNA は、例えば生来の cDNA を鋳型として、PCR 増幅、部位特異的変異誘発、等の常用手段により調製することができる。

本発明のポリペプチド又は蛋白質は、対応する DNA を適当な宿主中で発現させることにより得られる。この場合、宿主としては、真核細胞、例えばヒト、サル、マウス、ハムスター、カエル等の高等真核生物の培養細胞、例えば、THP-1 細胞、MC3T3-E1 細胞、XTC 細胞、Mv1Lu 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、等；下等真核細胞、例えば、糸状菌、例えばアスペルギルス (Aspergillus) 属糸状菌、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)；あるいは酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 等が使用される。さらに宿主としては、原核細胞、例えば細菌、例えば大腸菌 (Escherichia coli) 等が使用される。

これらの宿主において目的 DNA の発現を行う場合、宿主に応じて適当なプロモーター等の発現制御配列が使用される。例えば動物細

胞内での発現においては pCDM8, pSV, pEF等の各プロモーターを有するプラスミドが使用され、酵母宿主においては、例えば pNV11等のプラスミドが使用され、大腸菌においては例えば pGEMEX, pUEX等のプラスミドが使用される。

形質転換された宿主の培養は常法により行われることができる。また、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、トランスジェニック動物 (Glaser, V., SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993) やカイコ等の昆虫 (Maeda, S, et al., Nature (1985) 315, 592-594) を宿主として産生させることができる。産生されたポリペプチド又は蛋白質の回収・精製は、酵素の精製のために常用されている方法、例えば、遠心分離、濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー等により行うことができる。

本発明の TGF- $\beta$  ファミリーの情報伝達系を担うキナーゼである TGF- $\beta$  によって活性化されるキナーゼは、多くの疾患に関わっていることが知られている TGF- $\beta$  およびそのスーパーファミリーのシグナル伝達を抑制または促進する薬剤の検索に使用することにおいて有用である。

## 実施例

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

### 実施例 1. cDNAライブラリーの作製

マウス IL-3 依存性細胞系 BAF-B03 からの poly(A)-RNA から常法に従って cDNA を合成し、これを図 1 に示す酵母発現ベクター pNV11 (Nomiya-Tsuji, J. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9006-9010 (1991)) に、TDH3 プロモーターの制御の下に挿入して cDNA ライブラリーを作製した。

### 実施例 2. cDNA ライブラリーのスクリーニング

実施例 1 において調製した cDNA ライブラリーを、サッカロミセス・セレビシエー (*Saccharomyces cerevisiae*) SY1984-P (*his3*Δ, *stell1*Δ, *FUS1p::HIS3*, *STE7P368*) を用いてスクリーニングした。この酵母では、接合フェロモンの情報伝達系において、*Stell1* が変異してその活性が欠損しており、*Ste-7* の 368 位のセリンがプロリンにより置換されており、さらに *FUS1* 上流活性化配列が *HIS3* オープンリーディングフレームに連結されてレポーター遺伝子を形成している。この酵母株は生来の *his3* を欠失しており、従って、培地中に外来のヒスチジンが存在する場合、又は変異により欠損した *Stell1* 活性が補完された場合にのみ増殖し得る。

S. セレビシエー SY1984-P を種々のプラスミドにより形質転換した。使用したプラスミドは *YCplac22* (ベクター)、*pRS314PGKMEKKCT* (*PGK1* プロモーターの下流の N-末端ドメインを欠く *MEKKΔN* (K. J. Blumer ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, 4925 (1994)) を発現する)、及び *pADU-RafΔN* (*ADH1* プロモーターから N-末端ドメインを欠く *RafΔN* を発現する) (K. Irie ら、*Science* Vol. 265, 1716 (1994)) である。これらの形質転換体をヒスチジンを欠く SC-His プレートに塗布し、そして 30℃ にてインキュベートした。その結果、*YCplac22* ベクターにより形質転換された酵母は増殖せず、*pRS314PGKMEKKCT* 又は *pADU-RafΔN* により形質転換された酵母は増殖した。これにより、このスクリーニング系は有効であることが確認された。

次に、前記スクリーニング系酵母株 SY1984-P を、実施例 1 において作製した cDNA ライブラリーにより形質転換し、SC-His プレート上でスクリーニングしたところ、1 個の陽性クローン *pNV11-HU11* が得られた。このクローンの cDNA を *TAK1ΔN cDNA* と称する。この cDNA のヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド・チェーン・ターミネ

ーション法により決定した。そのヌクレオチド配列は、配列番号：1中のヌクレオチド223～1893の配列に相当し、それによりコードされているアミノ酸配列は配列番号：1のアミノ酸配列中23位の Ser～579位の Serに相当する。

次に、全長cDNAをクローニングすべく、前記TAK1 $\Delta$ N cDNAを放射能標識してプローブとして使用し、実施例1において得たcDNAライブラリーをさらにスクリーニングした。こうして、複数の陽性クローンを得た。このクローンのcDNAをpBSベクター（Stratagene社製）のEcoRI部位にサブクローニングし、pBS-TAK1-5'を得た。このクローンは開始コドンATGを含有する全長クローンであった。このcDNAをTAK1 cDNAと称する。そのヌクレオチド配列を配列番号：1に示す。この配列の内ヌクレオチド番号1～2443に全長アミノ酸配列である1位の Met～579位の Serがコードされている。

### 実施例3. TAK1遺伝子の組織分布

マウスの種々の組織から全RNAを抽出し、前記TAK1 cDNAを放射能ラベルしたものをプローブとして用いてノーザンブロッティングを行ったところ、TAK1 cDNAとハイブリダイズするRNAは試験したすべての組織又は器官（脾臓、胸腺、肺、心臓、肝臓及び脳）において発現していた。脾臓、胸腺及び脳には高レベルで存在し、そして肺、心臓及び肝臓には低レベルで存在した。

### 実施例4. TAK1キナーゼの性質

哺乳動物細胞でのTGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼの機能を調べるため、TAK1 cDNA及びTAK1 $\Delta$ N cDNAを哺乳類発現ベクターpEF (H. Shibuya et al., Nature Vol.357, 700 (1992))に、ヒトエロゲンゲーションファクター (EF) プロモーターの制御下に挿入し、発現プラスミドpEF-TAK1及びpEF-TAK1 $\Delta$ Nを得た。発現プラスミドpEF-TAK1及びpEF-TAK1 $\Delta$ Nはそれぞれ全長TAK1コード配列及びTAK1 $\Delta$

N コード配列をEFプロモーターの制御のもとに含有している。

すなわち、pNV11-HU11の 2.3kbの Xho I 断片を pBSの Xho I ギャップに挿入してpBS-TAK1 $\Delta$ Nを得た。pEF-MSS1(H. Shibuyaら、Nature Vol. 357, 700 (1992))をEcoRI及びXbaIにより開裂せしめ、そしてこれに、合成EcoRI - XhoI リンカー (センス鎖: 5' - AA TTCGCCACCATGGC - 3') (配列番号: 2) ; アンチセンス鎖: 5' - TCGAGCCATGGTGGCG - 3') (配列番号: 3) (開始コドン ATGを含有する)、並びにpBS-TAK1 $\Delta$ NからのXhoI - HindIII断片及びHindIII - XbaI断片を挿入することによりpEF-TAK1 $\Delta$ Nを作製した。pBSをEcoRI及びXhoIにより開裂せしめ、これにpBS-TAK1-5'からのEcoRI - SacI断片、及びpBS-TAK1 $\Delta$ NからのSacI - XhoI断片を挿入することにより、TAK1の全長cDNA(TAK1 cDNA)を含有するpBS-TAK1を得た。pEF-MSS1をEcoRI及びSalIにより開裂せしめ、これにpBS-TAK1からのEcoRI - SacI断片を挿入することによりpEF-TAK1を作製した。

尚、プラスミドpEF-TAK1を含有する大腸菌はEscherichia coli MC1061/P3 (pEF-TAK1) として、そしてプラスミドpEF-TAK1 $\Delta$ Nを含有する大腸菌Escherichia coli MC1061/P3 (pEF-TAK1 $\Delta$ N) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に平成7年9月28日、それぞれ、受託番号FERM-BP-5246およびFERM-BP-5245の下ブダベスト条約に基づき国際寄託された。

プラスミドpEF-TAK1に含まれるTAK1遺伝子は適切な制限酵素、例えばEcoRIおよびBamHIを用いて切り出すことができる。

種々のリガンドによる遺伝子発現の誘導に対するTAK1の効果を試験した結果、TAK1はTGF- $\beta$ による遺伝子誘導に対して効果を有することが見出された。TGF- $\beta$ に対する初期細胞性応答はプラスミノー

ゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) のmRNAレベルの上昇を誘導する (M. R. Keeton et al., J. Biol. Chem. Vol. 266, 23048 (1991))。

そこで、TGF- $\beta$  応答に対するTAK1の効果を検討するため、TGF- $\beta$  により誘導される PAI-1プロモーターにより制御されるルシフェラーゼ遺伝子を含むTGF- $\beta$  リポータープラスミドp800neoLUC (M. Abe et al., Analyt. Biochem., Vol. 216, 276 (1994)) を、Mv1Lu肺上皮細胞に、リン酸カルシウム法 (H. Shibuyaら、Nature Vol. 357, 700 (1992)) により一過性トランスフェクションした。この測定法においては、Mv1Lu肺上皮細胞へのp800neoLUCのトランスフェクションによりTGF- $\beta$  により誘導されるルシフェラーゼ活性の測定が可能となる。p800neoLUCにより一過性にトランスフェクトされた Mv1Lu細胞は、4～5倍の増強されたリポーター遺伝子活性をもってTGF- $\beta$  に応答した。この結果を図2のベクターの欄に示す。

前に作製したTAK1又はTAK1 $\Delta$ N 発現プラスミドをp800neoLUCと共に Mv1Lu細胞に一過性に同時トランスフェクトした。TAK1の発現によりTGF- $\beta$  誘導性遺伝子発現がわずかに増強され、そしてTAK1 $\Delta$ N は PAI-1遺伝子発現を構成的に活性化した (図2のTAK1 $\Delta$ N の欄)。TAK1 $\Delta$ N によるリポーター遺伝子の構成的発現のレベルはTGF- $\beta$  により処理されたトランスフェクタントにおけるレベルに匹敵する。従って、活性化されたTAK1 (すなわちTAK1 $\Delta$ N) はTGF- $\beta$  の非存在下でシグナルを伝達することができる。さらに、TAK1 $\Delta$ N トランスフェクタントにTGF- $\beta$  を添加した場合 PAI-1遺伝子の発現はさらに増加した。

なお、図2において、白い棒はTGF- $\beta$  による誘導を行わなかった場合を示し、斜線を付した棒はTGF- $\beta$  による誘導を行った場合を示す。上記の実験においては、トランスフェクションの後、細胞をヒ



トTGF- $\beta$ 1(30ng/ml)の存在下又は非存在下で20時間培養し、細胞から抽出液を調製し、そして、H.Shibuyaら、Mol.Cell.Biol. Vol. 14, 5812 (1994)に記載されているようにしてルシフェラーゼ測定を行った。図2のグラフでは、ベクター(TAK1遺伝子含有しない)により形質転換された細胞をTGF- $\beta$ 1により誘導しなかった場合のルシフェラーゼ活性を1として、相対活性を示す。棒グラフの結果は、1実験につき3連の実験結果の平均を示す。

上記の結果がTAK1のキナーゼ活性により介在されることを確認するため、触媒的に不活性なTAK1 $\Delta$ N-K63Wを作製した。これは、PCRを用いて部位特異的変異誘発により行った。このベクターにおいては、ATP結合部位における63位のリジンがトリプトファンにより置換されている。この変異はTAK1 $\Delta$ Nのキナーゼ活性及びシグナル伝達活性を失活させると予想される。TAK1 $\Delta$ N-K63Wをp800neoLUCと共に同時トランスフェクトすると、PAI-1遺伝子発現を構成的に刺激する能力が失われた(図2)。これらの結果が示唆するところによれば、PAI-1遺伝子のTGF- $\beta$ 非依存的発現のためにはTAK1 $\Delta$ Nのキナーゼ活性が必要である。さらに、キナーゼ・ネガティブTAK1 $\Delta$ NはTGF- $\beta$ による誘導発現の部分的低下を惹起した。これらの結果が示唆するところによれば、TAK1はTGF- $\beta$ 介在シグナル伝達経路のメディエーターとして機能すると考えられる。

TAK1がTGF- $\beta$ 介在シグナル伝達経路において機能することの直接的な証拠を得るために、TGF- $\beta$ による細胞の処理によってTAK1のキナーゼ活性が活性化されるか否か決定した。適当な外来性基質の同定のため、ヘマグルチニン(HA)エピトープにより標識されたTAK1(TAK1-HA)(抗-HAモノクローナル抗体12CA5により認識されるエピトープをコードするDNA配列をPCRによりTAK1をコードするDNAの3'-末端にフレームを合わせて連結したもの)を発現する酵母細

胞から免疫沈降されたTAK1のインビトロ・キナーゼ反応を行った。

このイムノコンプレックスキナーゼ測定が示すところによれば、活性形のTAK1は MAPKKの XMEK2/SEK1サブファミリー (B. M. Yasher et al., Nature Vol. 372, 794 (1994))をリン酸化し、そして活性化することができた。他方、もともとのMAPKK-MEK1 (E. Nishida et al., Trends Biochem. Sci., 128 (1993) ; K. J. Blumer et al., ibid Vol. 19, 286 (1994) ; R. J. Davis, ibid Vol. 19, 470 (1990) ; C. L. Marshall, Cell, Vol. 80, 179 (1995))、ヒストン及びミエリン塩基性蛋白質のリン酸化は検出されなかった。従って、TAK1キナーゼ活性は、インビトロで XMEK2を活性化するその能力について測定することができる。

HAエピトープ標識化TAK1(HA-TAK1)の発現用構成物を次の様にして作製した。モノクローナル抗体 12CA5により認識されるHAエピトープTyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala(配列番号: 4)をコードする合成オリゴヌクレオチドをpBS-TAK1の Sal I 部位(ATGコドンから+3位)及びEcoR I 部位にクローニングして pBS-HA-TAK1を作製した。pEF-MSS1をEcoR I 及び Sal I により開裂せしめ、そしてそれに pBS-HA-TAK1からのEcoR I - Xho I 断片を挿入することにより pEF-HA-TAK1を作製した。

pBS-HA-TAK1 $\Delta$ N を作製するため、pNV11-HU11を Xho I 及びHind III により消化した。この断片を単離し、そして pBS-HA-TAK1のHinc II - HindIII 部位に挿入した。pEF-MSS1をEcoR I 及び Sal I で開裂せしめ、そしてそれに pBS-HA-TAK1 $\Delta$ H からの Pst I - Xho I 断片を挿入することにより pEF-HA-TAK1 $\Delta$ N を作製した。これら両構成物はEFプロモーターから発現されるN-末端HAエピトープの2つのコピーを有する。

これらの構成物 pEF-HA-TAK1又は pEF-HA-TAK1 $\Delta$ H をMC3T3-E1マ

ウス骨芽細胞 (S. Ohtaら、FEBS Lett. Vol. 314, 356 (1992)) に一過性にトランスフェクトした。TGF- $\beta$ 1 による刺激の後、発現された HA-TAK1を免疫沈降により単離し、そしてその活性をカップル・キナーゼ測定(coupled kinase assay)(S. Matsudaら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12969 (1995)) により測定した。

すなわち、トランスフェクトされた細胞をTGF- $\beta$ 1(20ng/ml) 又はBMP-4 (100ng/ml) により0分間(未処理)～30分間処理した。細胞を緩衝液中にかきとり(S. Matsudaら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12781 (1995) ; T. Moriguchiら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12969 (1995))、そして細胞抽出液を15,000×gにて10分間遠心分離した。得られた上清を抗HA抗体による免疫沈降にかけた。すなわち、前記上清の300 $\mu$ lのアリコートに20 $\mu$ lの抗体及び20 $\mu$ lのプロテインAセファロースと混合し、そしてイムノコンプレックスをPBSで2回洗浄し、そしてこれを用いてキナーゼ測定を行った(S. Matsudaら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12781 (1995) ; T. Moriguchiら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12969 (1995))。

活性は刺激されていない細胞からの HA-TAK1の活性に対する増加倍数として示す。免疫沈降したTAK1の活性は、組換え XMEX2/SEK1を活性化その能力により測定した。なお、XMEX2/SEK1の活性は、組換えキナーゼ・ネガティブ(KN) p38/MPK2をリン酸化する能力により測定した(S. Matsudaら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12781 (1995) ; T. Moriguchiら、J. Biol. Chem. Vol. 270, 12781 (1995))。

HA-TAK1がKN-p38/MPK2を直接リン酸化しないことは確認されている。なお、各免疫沈降の抗-HA-抗体によるイムノプロットングによれば、各時点での免疫沈降においてほとんど同量の HA-TAK1が回収された。

上記の実験の結果、TAK1キナーゼ活性はTGF- $\beta$ による刺激の後5

分間以内に増加しはじめ、10分後にピークに達し、そして30分以内にほとんどベースラインにもどった（図3）。さらに、TGF- $\beta$ 1はTAK1キナーゼ活性を投与量依存的に刺激した（図4）。次に、TAK1がTGF- $\beta$ スーパーファミリーの1員であるBMP（A. H. Reddiら、Curr. Opin. Genet. Dev. Vol. 4, 737（1994））、又は上皮成長因子（EGF）により活性化されるか否かを調べた。興味あることには、BMP-4もまたTAK1キナーゼを時間-及び用量-依存的に活性化した（図4）。

他方、EGFにより処理された細胞においてはTAK1の活性化は観察されなかった。EGFがTAK1の活性化を誘導しないのはMC3T3-E1細胞がEGFに応答しないためではなく、EGFのシグナルがTAK1を介在していないためであると考えられる。それはEGFはMC3T3-E1細胞中でfosの発現を誘導することからもわかる。これらのデータが相俟って、TAK1がTGF- $\beta$ スーパーファミリーにより活性化されることを示している。

TAK1 $\Delta$ NはTGF- $\beta$ 非依存的にPAI-1遺伝子の発現を活性化することができ（図2）、このことは、細胞のTGF- $\beta$ 処理が無くてもTAK1 $\Delta$ N蛋白質が上昇したキナーゼ活性を有することを示唆している。この可能性を試験するため、HAエピトープで標識されたTAK1 $\Delta$ N（HA-TAK1 $\Delta$ N）（前記）をMC3T3-E1細胞に一過性にトランスフェクトし、そしてTAK1 $\Delta$ Nの活性をイムノコンプレックスキナーゼ測定により測定した。すなわち、MC3T3-E1細胞をpEF-HA-TAK1 $\Delta$ Nによりトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞からHA-TAK1 $\Delta$ Nを前記のようにして免疫沈降せしめ、そしてその活性を測定した。

すべてのデータを、刺激されていない細胞からのHA-TAK1の活性に対する増加倍率により示す。

図4に示す通り、TAK1 $\Delta$ N蛋白質はより高い本質的キナーゼ活性

を示し、N-末端の22アミノ酸残基を欠くTAK1 $\Delta$ Nは構成的に (constitutively) 活性であるとする仮説を支持している。

#### 実施例 5. cDNAライブラリーの作製

ヒトT細胞株Jurkat細胞からpoly(A)RNAを調製し、常法に従ってcDNAを合成した。これを酵母の発現ベクターpNV7 (Ninomiya-Tsuji, J., ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9006-9010 (1991)) のTDH3プロモーターの下流に挿入してcDNAライブラリーを作製した。

#### 実施例 6. cDNAライブラリーのスクリーニング

サッカロマイセス・セレビジエー (*Saccharomyces cerevisiae*) の高浸透圧ストレスの情報伝達系で働く、Ssk2/Ssk22、およびSho1の活性を欠損させた変異株は、YEPD培地 (Yeast extract (10 g / l)、tryptone (20 g / l)、glucose (20 g / l)) では増殖できるが、この培地に1 Mソルビトールを添加した培地中では増殖できない (T. Maeda, ら、Science, 269, 554 (1995))。従って、この変異株にcDNAを導入してスクリーニングを行うことにより、欠損したSsk2/Ssk22 活性を補完できるcDNAが単離できる。

実際に、上述の文献に記載されているSsk2/Ssk22、およびSho1の活性を欠損させたサッカロマイセス・セレビジエー株 (ssk2 $\Delta$ , ssk22 $\Delta$ , sho1 $\Delta$ ) を実施例2で得たpNV11-HU11 (マウスTAK1 $\Delta$ N) により形質転換した。この形質転換体を1 Mソルビトールを含むYEPDプレートに塗布し、30℃にてインキュベートした。その結果、pNV11-HU11により形質転換された酵母は高浸透圧ストレス下でも増殖した。これにより、このスクリーニング系は有効であることが確認された。

そこで、このサッカロマイセス・セレビジエー株 (ssk2 $\Delta$ , ssk22 $\Delta$ , sho1 $\Delta$ ) を、実施例5において作製したcDNAライブラリーにより形質転換し、高浸透圧ストレス下でスクリーニングを行った。

1 Mソルビトールを含むYEPD培地中、30℃にてインキュベートした。)。その結果、1個の陽性クローンpNV7-hTAK1が得られた。このクローンに含まれるcDNAを、PRISM Dye Terminator Cycle Sequencingキット(Perkin Elmer製)により増幅し、その塩基配列を決定した。その塩基配列及びその対応アミノ酸配列は配列番号: 5に示す通りであった。このcDNAの塩基配列はマウスTAK1の塩基配列と92%の相同性を示し、それによりコードされるアミノ酸配列はマウスTAK1のアミノ酸配列と99%の相同性を示した。マウスTAK1とヒトTAK1の塩基配列の対比を図5～図9に示し、これらのアミノ酸配列の対比を図10及び図11に示す。

ヒト TAK1 cDNAを、SalIで消化した pUC19にサブクローニングして、ヒトTAK1の全長cDNAを含有するプラスミドphTAK1を得た。このプラスミドphTAK1を含有する大腸菌は、*Escherichia coli* JM109 (phTAK1) と称し、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM BP-5598として、1996年7月19日に、ブダペスト条約に基き国際寄託された。

#### 微生物の寄託

以下の微生物を、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)の特許微生物寄託センターに寄託し、以下の受託番号を得た。

菌 名: 大腸菌 (*Escherichia coli*) MC1061/P3 (pEF-TAK1)

寄託日: 1995年9月28日

受託番号: FERM BP-5246

菌 名: 大腸菌 (*Escherichia coli*) MC1061/P3 (pEF-TAK1ΔN)

寄託日: 1995年9月28日

受託番号: FERM BP-5245

菌 名: *Escherichia coli* JM109 (phTAK1)

**WO 98/03663**

**PCT/JP97/01050**

寄託日：1996年 7 月 19日

受託番号：FERM BP-5598

## 配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2443

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配 列

GAATTCGGCA CGAGGAGGAG CCGAAGCCGG GACTCGGCGG TGGCCCGGGT CGGTCCCGCG	60
CCACGGAGCG CCGGGCGGCG GGCTGCGGGG CTCCGGGCTG AAGGGCGCTG CGCGAGCCGG	120
AGGGCGGGCG CGGCCCCCGG GCGCCGCGG GGGATC ATG TCG ACA GCC TCC GCC	174
Met Ser Thr Ala Ser Ala	
1 5	
GCC TCG TCC TCC TCC TCG TCT TCT GCC AGT GAG ATG ATC GAA GCG CCG	222
Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Glu Met Ile Glu Ala Pro	
10 15 20	
TCG CAG GTC CTG AAC TTC GAA GAG ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG	270
Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val	
25 30 35	
GAA GAG GTT GTC GGA AGA GGA GCT TTT GGA GTA GTT TGC AAA GCT AAG	318
Glu Glu Val Val Gly Arg Gly Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys	
40 45 50	
TGG AGA GCA AAA GAT GTC GCT ATT AAA CAG ATA GAA AGT GAG TCT GAG	366
Trp Arg Ala Lys Asp Val Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu	
55 60 65 70	



AGG AAG GCT TTC ATT GTG GAG CTC CGG CAG TTG TCG CGT GTG AAC CAT	414
Arg Lys Ala Phe Ile Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His	
75 80 85	
CCT AAC ATT GTC AAG TTG TAC GGA GCC TGC CTG AAT CCA GTA TGT CTT	462
Pro Asn Ile Val Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu	
90 95 100	
GTG ATG GAA TAT GCA GAG GGG GGC TCA TTG TAT AAT GTG CTG CAT GGT	510
Val Met Glu Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly	
105 110 115	
GCT GAA CCA TTG CCT TAC TAC ACT GCT GCT CAT GCC ATG AGC TGG TGT	558
Ala Glu Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys	
120 125 130	
TTA CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAC CTG CAC AGC ATG CAG CCC AAA	606
Leu Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu His Ser Met Gln Pro Lys	
135 140 145 150	
GCG CTG ATT CAC AGG GAC CTC AAG CCT CCA AAC TTG CTG CTG GTT GCA	654
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val Ala	
155 160 165	
GGA GGG ACA GTT CTA AAA ATC TGC GAT TTT GGT ACA GCT TGT GAC ATC	702
Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys Asp Ile	
170 175 180	
CAA ACA CAC ATG ACC AAT AAT AAA GGG AGT GCT GCT TGG ATG GCG CCT	750
Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp Met Ala Pro	
185 190 195	
GAA GTG TTT GAA GGT AGC AAT TAC AGT GAA AAG TGT GAT GTC TTC AGC	798
Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys Asp Val Phe Ser	
200 205 210	

2 4

CAA CAG AGT GAA TCT GGA CGC CTG AGC TTG GGA GCC TCT CGT GGG AGC 1278  
 Gln Gln Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser  
 360 365 370  
 AGT GTG GAG AGC TTG CCC CCC ACT TCC GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT 1326  
 Ser Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala  
 375 380 385 390  
 GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCC AGG ATC GTG GCG ACT GCA GGT AAC GGG 1374  
 Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Val Ala Thr Ala Gly Asn Gly  
 395 400 405  
 CAA CCA AGG CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTT ACT GGG ACA GAA 1422  
 Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu  
 410 415 420  
 CCT GGT CAG GTG AGC AGC CGG TCA TCC AGC CCT AGT GTC AGA ATG ATC 1470  
 Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val Arg Met Ile  
 425 430 435  
 ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAG AAG CCA GCT CGC AGT CAC CCA TGG 1518  
 Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Ala Arg Ser His Pro Trp  
 440 445 450  
 ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAC ACC AAT GGC TCA GAT AAC TCC ATC CCA 1566  
 Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser Asp Asn Ser Ile Pro  
 455 460 465 470  
 ATG GCG TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAG CTA CAG CCT CTA GCG CCG TGC 1614  
 Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu Gln Pro Leu Ala Pro Cys  
 475 480 485  
 CCA AAC TCC AAA GAA TCC ATG GCA GTG TTC GAA CAG CAC TGT AAA ATG 1662  
 Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val Phe Glu Gln His Cys Lys Met  
 490 495 500

GCA CAG GAG TAT ATG AAA GTT CAA ACC GAA ATC GCA TTG TTA CTA CAG 1710  
 Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr Glu Ile Ala Leu Leu Leu Gln  
 505 510 515  
 AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA GAA TTG GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG 1758  
 Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln  
 520 525 530  
 CAA AAT ACA TCT CGT CTG GTA CAG GAA CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA 1806  
 Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu His Lys Lys Leu Leu Asp Glu  
 535 540 545 550  
 AAC AAA AGC CTT TCT ACT TAT TAC CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG 1854  
 Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu  
 555 560 565  
 GTC ATC AGA AGC CAA CAG CAG AAA CGA CAA GGC ACT TCA TGATTCTCTG 1903  
 Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg Gln Gly Thr Ser  
 570 575  
 GGACCGTTAC GTTTTAAAT ATGCAAAGAC CTTTTTTTAA GAGAAGACAA ACCATTATAA 1963  
 CAGTTCATGA GTGTTAGCTT TTTGGCGTGT TCTGAATGCC AAATGCCTCT CTTTGCTGCA 2023  
 TTTGTTATGT CAGTTACCTT TCTTCTTATG GTGGATATAA AATCCACTGT CGTGTTCAG 2083  
 CAGATGATGG CACCTGTGGC TTGGGAAGGC GAGSGTGCTC AGCTTCAGGG GCACATGAAG 2143  
 TGAACCTGGC TGTATGTGCA TGCTCCTGGA GTGAGCTACC TAACAGGAGG GGGTAGCACA 2203  
 CTGGCTACTG TGTGCAGGCA TCATCCTTTC TCTGTAGTAA AAGGTGGGAC CTCAAGAATT 2263  
 TTCTTCAAAG TGCTCATCTC AAAAATCTGA TTTTTTTCCC AGTAGATGGT ATGCTCCAAT 2323  
 GTAAAGACAG AGTATTAAAA TAAGTGTGG TACATTACAG AGGGACAGAA TGTTGAGGCT 2384  
 GAGTCAAAG ACAGGGTTTG TGCCAACACA TCCTGGCTTT AGAGCACAAT GGATCTCGAG 2443

配列番号 : 2

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配 列

AATTCGCCAC CATGGC

16

配列番号：3

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配 列

TCGAGCCATG GTGGCG

16

配列番号：4

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配 列

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

配列番号：5

配列の長さ：2656

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

## 配 列

GTCTGAGATCC ATTGTGCTCT AAAGACGGCT GTGGCCGCTG CCTCTACCCC CGCCACGGAT	60
CGCCGGGTAG TAGGACTGCG CGGCTCCAGG CTGAGGGTCG GTCCGGAGGC GGCTGGGCGC	120
GGGTCTCACC CGGATTGTCC GGGTGGCACC GTTCCCGGCC CCACCGGGCG CCGCGAGGGA	180
TC ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC	227
Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
1 5 10 15	
GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG ATC	275
Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu Ile	
20 25 30	
GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA GCC TTT	323
Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly Ala Phe	
35 40 45	
GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT GCT ATT AAA	371
Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val Ala Ile Lys	
50 55 60	
CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT GTA GAG CTT CGG	419
Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile Val Glu Leu Arg	
65 70 75	
CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA AAG CTT TAT GGA GCC	467
Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Tyr Gly Ala	
80 85 90 95	
TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA TAT GCT GAA GGG GGC TCT	515
Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu Tyr Ala Glu Gly Gly Ser	
100 105 110	

TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT	563
Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala	
115 120 125	
GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT	611
Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr	
130 135 140	
CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA	659
Leu His Ser Met Gln Pro Lys Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro	
145 150 155	
CCA AAC TTA CTG CTG GTT GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT	707
Pro Asn Leu Leu Leu Val Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp	
160 165 170 175	
TTT GGT ACA GCC TGT GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG	755
Phe Gly Thr Ala Cys Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly	
180 185 190	
AGT GCT GCT TGG ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT	803
Ser Ala Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser	
195 200 205	
GAA AAA TGT GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA	851
Glu Lys Cys Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile	
210 215 220	
ACG CGT CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC	899
Thr Arg Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile	
225 230 235	
ATG TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA	947
Met Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu	
240 245 250 255	

CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT CCT	995
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp Pro	
260 265 270	
TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT CAC TTG	1043
Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr His Leu	
275 280 285	
ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT CCT TGT CAG	1091
Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr Pro Cys Gln	
290 295 300	
TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT ACA GGC TCA TTC	1139
Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser Thr Gly Ser Phe	
305 310 315	
ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA AGT GAC ACT AAT ATG	1187
Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys Ser Asp Thr Asn Met	
320 325 330 335	
GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT AAG CGC TTA GAA TCA AAA	1235
Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile Lys Arg Leu Glu Ser Lys	
340 345 350	
TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC	1283
Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser	
355 360 365	
TTG GGA GCC TCC CAT GGG AGC ACT GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT	1331
Leu Gly Ala Ser His Gly Ser Ser Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser	
370 375 380	
GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC	1379
Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile	
385 390 395	



GCC GCA ACC ACA GGC AAC GGA CAG CCA AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC 1427  
 Ala Ala Thr Thr Gly Asn Gly Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp  
 400 405 410 415  
 TTG ACT GTA ACT GGA ACA GAA CCT GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC 1475  
 Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser  
 420 425 430  
 AGT CCC AGT GTC AGA ATG ATT ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG 1523  
 Ser Pro Ser Val Arg Met Ile Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys  
 435 440 445  
 CCA ACT CGA AGT CAT CCA TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT 1571  
 Pro Thr Arg Ser His Pro Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn  
 450 455 460  
 GGA TCA GAT AAC TCC ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA 1619  
 Gly Ser Asp Asn Ser Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln  
 465 470 475  
 CTA CAG CCT CTA GCA CCG TGC CCA AAC TCC AAA GAA TCT ATG GCA GTG 1667  
 Leu Gln Pro Leu Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val  
 480 485 490 495  
 TTT GAA CAG CAT TGT AAA ATG GCA CAA GAA TAT ATG AAA GTT CAA ACA 1715  
 Phe Glu Gln His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr  
 500 505 510  
 GAA ATT GCA TTG TTA TTA CAG AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA GAA CTG 1763  
 Glu Ile Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu  
 515 520 525  
 GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA TCT CGC CTG GTA CAG GAA 1811  
 Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu  
 530 535 540

CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA AGC CTT TCT ACT TAC TAC CAG 1859  
His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln  
545 550 555  
CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC ATC AGA AGT CAG CAG CAG AAA CGA 1907  
Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg  
560 565 570 575  
CAA GGC ACT TCA TGATTCTCTG GGACCGTTAC ATTTTGAAAT ATGCAAAGAA 1959  
Gln Gly Thr Ser  
AGACTTTTTT TTTAAGGAAA GGAAACCTT ATAATGACGA TTCATGAGTG TTAGCTTTTT 2019  
GGCGTGTCT GAATGCCAAC TGCCTATATT TGCTGCATTT TTTTCATTGT TTATTTTCCT 2079  
TTTCTCATGG TGGACATACA ATTTTACTGT TTCATTGCAT AACATGGTAG CATCTGTGAC 2139  
TTGAATGAGC AGCACTTTGC AACTTCAAAA CAGATGCAGT GAACTGTGGC TGTATATGCA 2199  
TGCTCATTGT GTGAAGGCTA GCCTAACAGA ACAGGAGGTA TCAAACCTAGC TGCTATGTGC 2259  
AAACAGCGTC CATTTTTTCA TATTAGAGGT GGAACCTCAA GAATGACTTT ATTCTTGTAT 2319  
CTCATCTCAA AATATTAATA ATTTTTTTCC CAAAAGATGG TATATACCAA GTTAAAGACA 2379  
GGGTATTATA AATTAGAGT GATTGGTGGT ATATTACGGA AATACGGAAC CTTTAGGGAT 2439  
AGTTCCGTGT AAGGGCTTG ATGCCAGCAT CCTTGGATCA GTACTGAACT CAGTTCCATC 2499  
CGTAAATAT GTAAAGGTAA GTGGCAGCTG CTCTATTTAA TGAAAGCAGT TTTACCGGAT 2559  
TTTGTTAGAC TAAAATTTGA TTGTGATACA TTGAACAAAA TGGAACTCAT TTTTTTTAAG 2619  
GAGTAAAGAT TTTCTTTAGA GCACAATGGA TCTCGAC 2656

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：5 に示す23位の Serから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、トランスフォーミング成長因子 (TGF)- $\beta$  によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチド。
2. 配列番号：5 に示す1位の Metから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$  によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチド。
3. 配列番号：5 に示す23位の Serから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$  によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
4. 配列番号：5 に示す 249位の Tから1919位の Aまでのヌクレオチド配列を有する請求項 3 に記載の DNA。
5. 配列番号：5 に示す1位の Metから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$  によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
6. 配列番号：5 に示す 183位の Aから1919位の Aまでのヌクレオチド配列を有する請求項 5 に記載の DNA。
7. 請求項 3 - 6 のいずれか 1 項に記載の DNAを含んでなるベクター。
8. 請求項 3 - 6 のいずれか 1 項に記載の DNAを含んでなるベクターにより形質転換された宿主細胞。
9. 請求項 3 - 6 のいずれか 1 項に記載の DNAを含んでなるベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、培養物から産生物を採取することからなる、TGF- $\beta$  によって活性化されるキナーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法。
10. 請求項 9 に記載の方法により製造されるTGF- $\beta$  によって活性

化されるキナーゼ活性を有するポリペプチド。

11. 配列番号：5に示す23位の Serから 579位の Serまでのアミノ酸配列を含んでなる、TGF- $\beta$ によって活性化されるキナーゼ。

12. 請求項1, 2, 10および11のいずれか1項に記載の蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質。

Fig.1

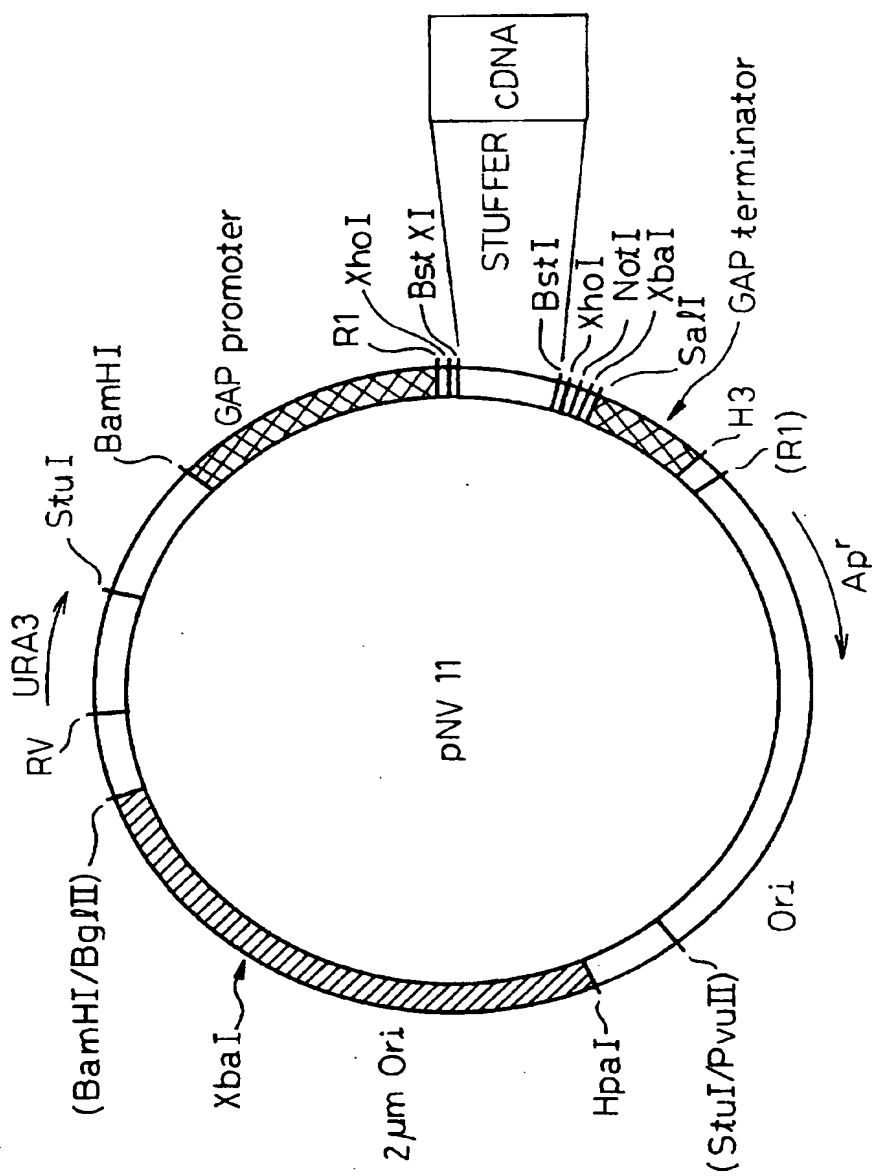


Fig.2

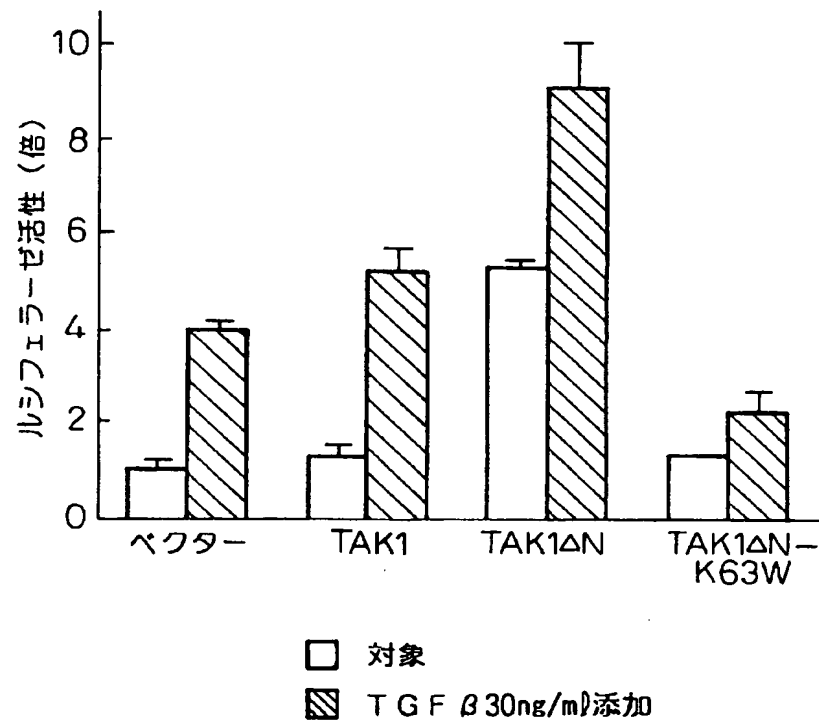


Fig.3

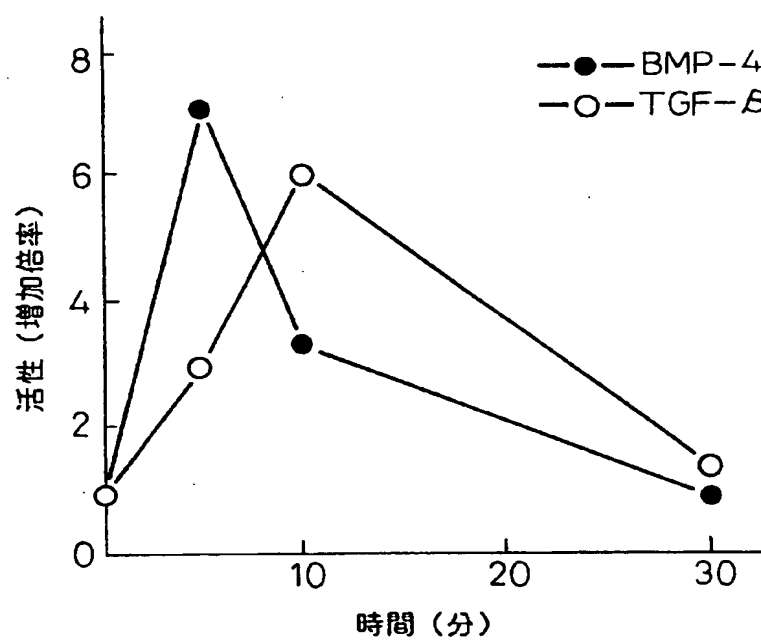
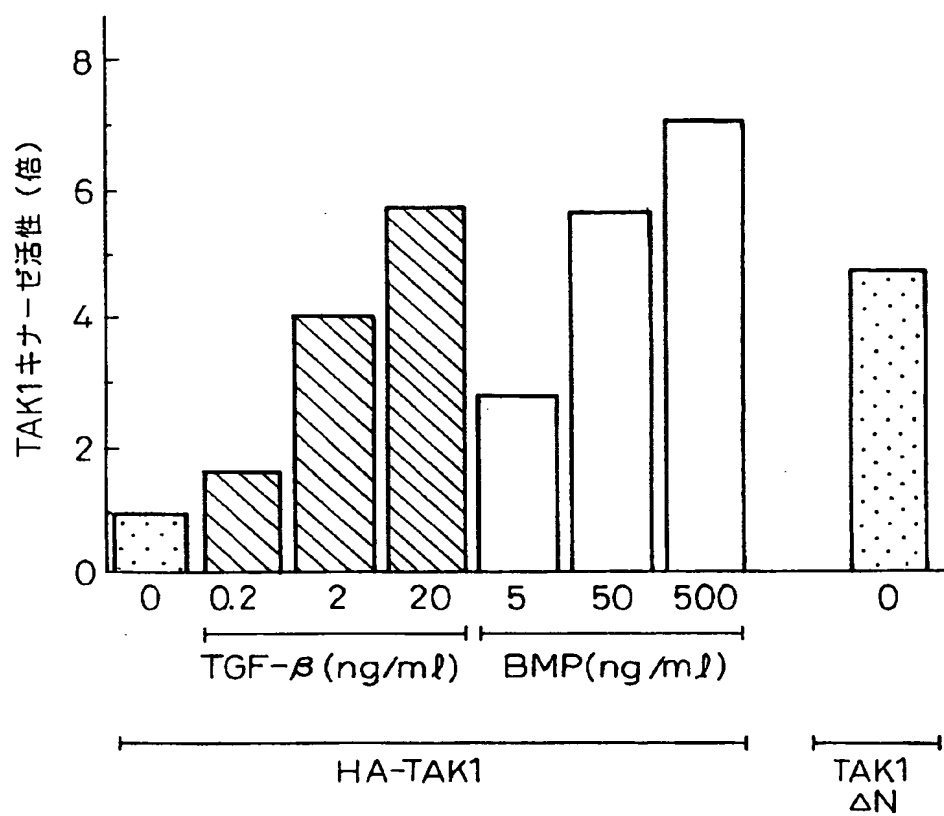


Fig.4





5. 6. 7.

[illegible]

Fig. 6

361' CCATTGCCATATTATCTGCTGCCCCACGCAATGAGTTGGTGTTCACAGTGTTCCTCCCAAGGA  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
 361" CCATTGCCTTACTACACTGCTGCTCATGCCATGAGCTGGTGTTCACAGTGTTCCTCCCAAGGA  
  
 421' GTGGCTTATCTTCACAGCATGCAACCCCAAGCGCTAATTCACAGGGACCTGAAACCCACCA  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*  
 421" GTGGCTTACCTGCACAGCATGCAGCCCCAAGCGCTGATTCACAGGGACCTCAAGCCTCCA  
  
 481' AACTTACTGCTGGTGCAGGGGGACAGTTCATAAAATTTGTGATTTTGGTACAGCCTGT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 481" AACTTGCTGCTGGTGCAGGAGGACAGTTCATAAAATCTGCGATTTTGGTACAGCTTGT  
  
 541' GACATTCAGACACACATGACCAATAACAAGGGGAGTGCTGCTTGGATGGCACCTGAAGTT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 541" GACATCCAAACACACATGACCAATAATAAAGGAGTGCTGCTTGGATGGCGCCTGAAGTG  
  
 601' TTTGAAGGTAGTAATTACAGTGAAAAATGTACGCTCTTCAGCTGGGGTATTATTCTTTGG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
 601" TTTGAAGGTAGCAATTACAGTGAAAAGTGTGATGCTCTTCAGCTGGGGTATTATCCTCTG

## Fig. 7

661' GAAGTGATAACGGTCGGAAACCCCTTGATGAGATTGGTGGCCAGCTTCCGAATCATG  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
661" GAAGTGATAACACGCCGGAAACCCCTTCGATGAGATCGGTGGCCAGCTTTCAGAATCATG  
\*\*\*\*\*  
721' TGGGCTGTTTCATAATGGTACTCGACCACTGATAAAAAATTACCTAAGCCCATTTGAG  
\*\*\*\*\*  
721" TGGGCTGTTTCATAATGGCACTCGACCACTGATCAAAATTTACCTAAGCCCATTTGAG  
\*\*\*\*\*  
781' AGCCTGATGACTCGTTGTTGGTCTAAGATCCTTCCCAGCGCCCTTCAATGGAGGAAATT  
\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
781" AGCTTGATGACACGCTGTTGGTCTAAGGACCCCATCTCAGCGCCCTTCAATGGAGGAAATT  
\*\*\*\*\*  
841' GTGAAAATAATGACTCACTTGATGCGGTACTTTCAGGAGCAGATGAGCCATTACAGTAT  
\*\*\*\*\*  
841" GTGAAAATAATGACTCACTTGATGCGGTACTTCCCAGGAGCGGATGAGCCATTACAGTAT  
\*\*\*\*\*  
901' CCTTGTCAGTATTCAGATGAAGGACAGAGCAACTCTGCCACCAGTACAGGCTCATTTCATG  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
901" CCTTGTCAGTACTCTGATGAAGGACAGAGCAACTCAGCCACCAGCAGCGCTCGTTTCATG  
\*\*\*\*\*  
961' GACATTGCTTCTACAAATACGAGTAACAAAAGTGACACTAATATGGAGCAAGTTCTCTGCC  
\*\*\*\*\*  
961" GACATTGCTTCTACAAATACCAGTAATAAAGTGACACAAATATGGAACAGGTTCTCTGCC

Fig. 8

1021' ACAAATGATACATAAGCGCTTAGAATCAAAATTGTTGAAAAATCAGGCAAAAGCAACAG  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 1021" ACAAAGACACTATTAACGCTTGGAGTCAAAACCTGTTGAAAAACCAGGCAAAAGCAACAG  
 1081' AGTGAATCTGGACGTTTAAGCTTGGAGCCTCCCATGGGAGCAGTGTGGAGAGCTTGCCCC  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*  
 1081" AGTGAATCTGGACGCTGAGCTTGGAGCCTCTCGTGGGAGCAGTGTGGAGAGCTTGCCCC  
 1141' CCAACCTCTGAGGGCAAGAGGATGAGTGTGACATGTCTGAAATAGAGCTAGGATCGCC  
 \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 1141" CCCACTTCGAGGGCAAGAGGATGAGTGTGACATGTCTGAAATAGAACCCAGGATCGTG  
 1201' GCAACCAAGGCAAGGACAGCAAGACGTAGATCCATCCAAGACTTGACTGTAACTGGA  
 \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 1201" GCGACTGCAGGTAACGGGCAACCAAGGCGTAGATCCATCCAAGACTTGACTGTACTGGG  
 1261' ACAGAACCTGGTCAGGTGAGCAGTAGGTATCCAGTCCAGTGTCAAGATGATTACTACC  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 1261" ACAGAACCTGGTCAGGTGAGCAGCGGTATCCAGCCCTAGTGTCAAGATGATCACTACC  
 1321' TCAGGACCAACCTCAGAAAAGCCAACCTCGAAGTCATCCATGGACCCCTGATGATTCCACA  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 1321" TCAGGACCAACCTCAGAGAAGCCAGCTCGCAGTCACCCATGGACCCCTGATGATTCCACA

## Fig. 9

1381' GATACCAATGGATCAGATAACTCCATCCCAATGGCTTATCTTACACTGGATCACCCTAACTA  
\*\* \*\*\*\*\*  
1381" GACACCAATGGCTCAGATAACTCCATCCCAATGGCGTATCTTACACTGGATCACCAGCTA  
\*\*\*\*\*  
1441' CAGCCTCTAGCACCGTGCCCAAACTCCAAAGAAATCTATGGCAGTGTGTTGAACAGCATTGT  
\*\*\*\*\*  
1441" CAGCCTCTAGCGCCGTGCCCAAACTCCAAAGAAATCCATGGCAGTGTTCGAACAGCCTGT  
\*\*\*\*\*  
1501' AAAATGGCACAGAATATATGAAAGTTCAACAGAGAAATGTCATTGTTATTACAGAGAAAAG  
\*\*\*\*\*  
1501" AAAATGGCACAGGAGTATATGAAAGTTCAACCGGAAATCGCATGTTTACTACAGAGAAAAG  
\*\*\*\*\*  
1561' CAAGAACTAGTTGCAGAACTGGACCAGGATGAAAAGGACCAGCAAAATACATCTCGCCTG  
\*\*\*\*\*  
1561" CAAGAACTAGTTGCAGAAATGGACCAGGATGAAAAGGACCAGCAAAATACATCTCGTCTG  
\*\*\*\*\*  
1621' GTACAGGAACATAAAAAGCTTTTAGATGAAAACAAAAGCCTTTCTACTTACTACCAGCAA  
\*\*\*\*\*  
1621" GTACAGGAACATAAAAAGCTTTTAGATGAAAACAAAAGCCTTTCTACTTATTACCAGCAA  
\*\*\*\*\*  
1681' TGCAAAACAACTAGAGGTCATCAGAGTCAGCAGCAGAGAAACGACAGGCACCTTCATGA  
\*\*\*\*\*  
1681" TGCAAAACAACTAGAGGTCATCAGAGTCAGCAGCAGAGAAACGACAGGCACCTTCATGA  
\*\*\*\*\*

## Fig.10

```

1' MSTASAASSSSSAGEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV
*****
1" MSTASAASSSSSASEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV
*****
61' AIKQIESESEKAFIVELRQLSRVNHNPVIVKLYGACLPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE
*****
61" AIKQIESESEKAFIVELRQLSRVNHNPVIVKLYGACLPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE
*****
121' PLPYYTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC
*****
121" PLPYYTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC
*****
181' DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEGSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM
*****
181" DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEGSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM
*****
241' WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDPQRSMEIEIVKINTHLMRYFPGADEPLQY
*****
241" WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDPQRSMEIEIVKINTHLMRYFPGADEPLQY
*****

```

## Fig.11

301' PCQYDEGQNSATSTGSEMDIASTNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ  
\*\*\*\*\*  
301" PCQYDEGQNSATSTGSEMDIASTNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ  
\*\*\*\*\*  
361' SEGRSLGASHGSSVESLPPTSEKGRMSADMSEIEARIAATTGNGQPRRRSIQDLTVTG  
\*\*\*\*\*  
361" SEGRSLGASHGSSVESLPPTSEKGRMSADMSEIEARIVATAGNGQPRRRSIQDLTVTG  
\*\*\*\*\*  
421' TEPQVSSRRSSPSVRMITTSIPTSEKPTRSHPWTPDDSTDNTGSDNSIPMAYLTLDHQL  
\*\*\*\*\*  
421" TEPQVSSRRSSPSVRMITTSIPTSEKPARSHPWTPDDSTDNTGSDNSIPMAYLTLDHQL  
\*\*\*\*\*  
481' QPLAPCPNSKESMAVFEQHCCKMAQYMKVQTEIALLLQKQELVAELDQDEKQDQNTSRL  
\*\*\*\*\*  
481" QPLAPCPNSKESMAVFEQHCCKMAQYMKVQTEIALLLQKQELVAELDQDEKQDQNTSRL  
\*\*\*\*\*  
541' VQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKKQLEVIRSQQKQKQGT  
\*\*\*\*\*  
541" VQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKKQLEVIRSQQKQKQGT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01050

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/12, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/12, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPI,L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science 270 1995 K. Yamaguchi et al. "Identification of a member of the MAPKKK Family as a potential mediator of TGF- $\beta$ signal transduction" p. 2008-2011	1 - 12
Y	Hyuga Saito and others "New Molecular Genetics for Bio-Science (in Japanese)" (Nankodo) 1987 p. 235-236	12
A	Cell 80 1995 C.J. Marshall "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation" p. 179-185	1 - 12
A	Science 265 1994 J.F. Smothers et al. "Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the raf protein kinase" p. 1716-1719	1 - 12
A	Science 241 1988 Steven K. Hanks et al. "The protein kinase family: conserved features and	1 - 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 24, 1997 (24. 06. 97)

Date of mailing of the international search report

July 8, 1997 (08. 07. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01050

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	deduced phylogeny of the catalytic domains" p. 42-52  Nature 324 1986 Randall K. Saiki et al. "Analysis of enzymatically amplified $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$ DNA with allele-specific oligonucleotide probes" p. 163-166	1 - 12

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01050

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Intel<sup>6</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/12, C12N1/21

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Intel<sup>6</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/12, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE, BIOSIS, WPI/WPI, L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Science 270 1995 K.Yamaguchi et al. 「Identification of a member of the MAPKK K Family as a potential mediator of TGF- $\beta$ signal transduction」 p.2008-2011	1-12
Y	斎藤日向他編「バイオサイエンスのための新しい分子遺伝学」(南江堂) 1987 p.235-236	12
A	Cell 80 1995 C.J.Marshall 「Specificity of receptor tyrosine kinase signaling :transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation」 p.179-185	1-12
A	Science 265 1994 J.F.Smothers et al. 「Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the raf protein kinase」 p.1716-1719	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.06.97

国際調査報告の発送日

08.07.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

4B

9359

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Science 241 1988 Steven K. Hanks et al. 「The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains」 p. 42-52	1-12
Y	Nature 324 1986 Randall K. Saiki et al. 「Analysis of enzymatically amplified $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$ DNA with allele-specific oligonucleotide probes」 p. 163-166	1-12